

STUDIE VAN DE JAARCYCLUS VAN ENKELE HISTOCHEMISCH BEPAALDE
INDICATOREN VAN POLLUTIE-STRESS BIJ DE MOSSEL. I. METHODO-
LOGIE EN EERSTE RESULTATEN.

Peter M.J. HERMAN, Marianne HABETS en Carlo HEIP

RIJKSUNIVERSITEIT GENT
Instituut voor Dierkunde
Sectie Mariene Biologie
Ledeganckstraat 35
9000 Gent

Studie uitgevoerd in opdracht van de Beheerseenheid van het
Mathematisch Model van de Noordzee en het Schelde-estuarium
(Ministerie van Volksgezondheid), Ref. BH/21/86.

Inleiding.

Dit verslag behandelt de methodologie en de eerste resultaten van het musselstress experiment, dat aan de RUG uitgevoerd wordt in opdracht van de Beheerseenheid Mathematisch Model.

Het programma van dit experiment voorziet in het volgen van de jaarlijkse cyclus in een aantal fysiologische en histochemische stress-indicatoren in natuurlijke mossel-populaties langs de Belgische kust. Specifiek worden twee stations (Nieuwpoort en Oostende) ongeveer maandelijks bemonsterd, en zes stations (Koksijde, Nieuwpoort, Middelkerke, Wenduine, Knokke en Breskens) seizoenaal.

Het volgen van de jaarlijkse cyclus in deze indicatoren is van belang voor het opzetten van routinematige stress-monitoring programma's. Het is immers bekend dat zowel de fysiologische als de histochemische responsen sterk kunnen variëren gedurende het jaar.

De belangrijkste factoren die deze conditie-index bepalen zijn de beschikbaarheid van voedsel, de reproductieve cyclus en de temperatuur. Widdows (1978) onderzocht de invloed van voedselconcentratie en "seizoenaal effect" op vele fysiologische variabelen in een multifactoriele studie. Hij vond dat beide factoren een significante invloed uitoefenen op de respiratorische intensiteit (na correctie voor lichaamsgewicht), de assimilatie-efficiëntie en de ammonium-excretie.

Voor de histochemische stress-indicatoren wordt in het algemeen de mogelijke interferentie van seizoenaal gebonden factoren met de resultaten van de testen beschreven (Bayne et al., 1985). Dit geldt in het bijzonder voor interferentie van de reproductieve cyclus. De afzet van gameten schijnt de conditie van de dieren zeer negatief te beïnvloeden, wat bv. tot uiting komt in een vermindering van de stabiliteit van de lysosomale membranen. Eenzelfde vermindering zou ook kunnen voorkomen door temperatuursinvloed (hoge of lage temperaturen).

Het is bekend dat de reproductieve cyclus van de mossel sterk kan variëren naargelang de groeiplaats. Zo hebben mosselen in sommige streken een duidelijke najaarspiek in de reproductie, terwijl in andere streken de reproductie tot het voorjaar beperkt blijft.

Het grote belang van seizoenale interferenties, en de onbeschikbaarheid van basisgegevens over bv. de reproductieve cyclus van mosselen uit de Belgische kustzone maakten het noodzakelijk de seizoenale evolutie van de bestudeerde stress-indicatoren te volgen.

In dit verslag zullen we voornamelijk ingaan op de methodologische aspecten van enkele nieuwe technieken (in vergelijking met het programma 1985). We beschikken op dit ogenblik over de volledige resultaten van slechts 3 staalnames, zodat over een eventuele jaarlijkse cyclus nog

weinig kan gezegd worden. Een grondige diskussie van de resultaten zal dan ook uitgesteld worden tot na het beeindigen van de volledige jaarcyclus.

Methodologie.

De methoden voor het bepalen van de stabiliteit van de lysosomale membranen, de aktiviteit van het NADPH - neotetrazolium reductase (NTR) en de aanwezigheid van metalloproteinen (Shikata - test) zijn onveranderd gebleven in vergelijking met het vorige programma. Bijlage 1, overgenomen uit het verslag van dit programma (Herman et al. 1986), geeft een inleidende beschrijving van deze methoden. Bijlage 2, overgenomen uit de technische bijlagen van het kontrakt, geeft het volledige protokol.

De stabiliteit van de lysosomale membranen werd beoordeeld als die labiliseringsstijd waarna een maximale kleuring van de lysosomen werd verkregen.

De aktiviteit van het NTR werd beoordeeld in een schaal van 0 (geen kleuring) tot 5 (zeer intense kleuring).

De Shikata-test werd beoordeeld als -1 (geen reaktie), 0 (zwakke, enkel plaatselijke reaktie) of +1 (algemene reaktie).

De beoordeling van het resultaat van de testen werd telkens onafhankelijk door twee personen uitgevoerd. Meestal kwamen de resultaten zeer goed overeen. Voor de stabiliteit van de lysosomale membranen was de Kendall's rang-correlatiecoëfficient tussen twee reeksen van 55 waarnemingen gelijk aan 0.95 ($P < 0.001$). Voor de NTR-test was deze coëfficient voor twee reeksen van 75 waarnemingen 0.98 ($P < 0.001$).

Voor die coupes waar geen overeenstemming bestond verschilde de score steeds maar 1 eenheid. In die gevallen werd een diskussie gewijd aan de betreffende coupe. Wanneer geen overeenstemming kon bereikt worden werd de kleuring overgedaan, en de beoordelingsprocedure herhaald.

De drie genoemde bepalingen werden in de eerste fase van het huidige onderzoek aangevuld met een aantal nieuwe indicatoren, die hieronder zullen beschreven worden. Voor het aantonen van zware metalen werd de Timm sulfide methode toegepast. Als indicator van algemene stress werd, naast de stabiliteit van de lysosomale membranen, eveneens de aanwezigheid van lipofuscine bestudeerd. De reproductieve toestand van elke mossel werd genoteerd. Er werd tenslotte een eerste poging gedaan om de ouderdom van de mosselen precies te bepalen aan de hand van de "acetate peel" methode.

Danscher & Zimmer (1978) geven een uitvoerige beschrijving van een verbeterde Timm sulfide methode voor het aantonen van zware metalen in weefselcoupes. Het principe van deze methode is dat de metalen, aanwezig in het weefsel, gereduceerd worden met vorming van metaalsulfiden. Daartoe worden de weefsels in een oplossing van Na_2S in fosfaatbuffer gebracht. De sulfiden worden nadien aangetoond in een "ontwikkelbad": de coupes worden geïncubeerd in een mengsel van arabische gom, hydroquinone en zilvernitraat. De metaalsulfiden veroorzaken een reductie van het zilver, dat als metallisch zilver neerslaat. De zwarte korrels metallisch zilver worden gemakkelijk mikroskopisch waargenomen.

De methode werkt optimaal als het te bestuderen organisme vooraf geperfuseerd wordt met de natriumsulfide-oplossing. Dit is evenwel onmogelijk uit te voeren met ons materiaal. Bovendien is het beter om de verschillende testen uit te voeren op dezelfde organismen. Het bleek uit onze testen dat vriescoupes, gefixeerd in glutaraaldehyde en ondergedompeld in de reagentia, uitstekende resultaten gaven. Het protocol opgenomen in Bijlage 3 geeft de methode weer, zoals ze nu door ons toegepast wordt.

Volgens Danscher & Zimmer (1978) is de Timm sulfide methode zeer specifiek voor metalen die onoplosbare of zwak oplosbare metaalsulfiden vormen. Andere chemische bestanddelen van de weefsels geven geen noemenswaardige kleuring. Bovendien treedt de reactie slechts op bij hoge gehalten aan metalen ("is indicative of high metal content"). Het omgekeerde is echter niet waar: sommige metalen zijn zo gebonden dat ze geen Timm sulfide reactie geven. Binnen de metalen is de methode echter niet specifiek: het is onmogelijk uit te maken met deze methode met welk metaal men te maken heeft. Een mogelijke uitzondering vormt kwik dat onder de vorm van kwiksulfide in het lichaam aanwezig is: dit zou reactie kunnen geven zonder voorbehandeling met sulfide. Dit aspect hebben wij nog niet verder onderzocht. Het ligt echter in onze bedoeling de aanwezigheid van kwik in de mosselen op deze manier te onderzoeken.

De Timm sulfide methode in de hepatopancreas van de mosselen toont duidelijk aan dat metalen vooral aanwezig zijn in de cellen die de wand van de verteringstubuli uitmaken. Binnenin deze cellen schijnen zij gelieerd te zijn met de lysosomen: er is een opvallende gelijkenis met het patroon van de kleuring der lysosomen, dat bekomen wordt bij de studie van de stabiliteit der lysosomale membranen. In het bindweefsel worden weinig metalen teruggevonden.

De Timm sulfide methode geeft een veel duidelijker beeld van de aanwezigheid van metalen dan de Shikata-test. De bruikbaarheid ervan als indicator van stress is echter beperkt. Het blijkt namelijk zo te zijn dat altijd een positieve reactie verkregen wordt. Dit resultaat is niet onlogisch, vermits alle dieren noodzakelijk een minimale hoeveelheid zware metalen bevatten, bv. als cofactoren van enzymen. De intensiteit van de kleuring verschilt nochtans van individu tot individu, en vertoont een zekere correlatie met de intensiteit van kleuring met de Shikata-test. Een quantificering van de kleurintensiteit zou een mogelijkheid zijn om deze methode alsnog te gebruiken in de pollutie-studie. Deze mogelijkheid zullen we zeker verder onderzoeken.

Het aantonen van lipofuscine in de lysosomen is een techniek die recent werd toegepast in het onderzoek naar stress-indicatoren bij mosselen (Moore et al., 1985). Lipofuscine is een pigment dat gevormd wordt door peroxidatie van lipiden en de daarop volgende polymerisatie. De intensiteit van autofagocytose en van peroxidatie van lipiden beïnvloedt de accumulatiesnelheid van lipofuscine. Het is bekend dat lipofuscine accumuleert in levercellen als gevolg van verschillende ziekten; accumulatie wordt ook waargenomen bij het verouderen van cellen. Moore et al. (1985) toonden aan dat blootstelling van *Littorina littorea* aan 400 ug/l phenantreen een sterke stijging van de lipofuscine concentratie tot gevolg had. Na het toedienen van phenantreen gedurende drie dagen werden de dieren overgebracht in zuiver zeewater. Gedurende deze recuperatie - periode verminderde het gehalte aan lipofuscine tot het niveau voor blootstelling.

We hebben de techniek voor het aantonen van lipofuscine met succes toegepast op ons materiaal. Het protocol van deze methode is opgenomen in Bijlage 4. De lipofuscine - concentraties werden bepaald in de mosselen die verzameld werden op 6 oktober. In overeenstemming met de lage stabiliteit van hun lysosomale membranen, vertoonden zij zeer intense kleuring voor lipofuscine. Om deze kleurintensiteit te quantificeren zal meer en diverser materiaal moeten verzameld worden. Wij voorzien het gebruik van een relatieve schaal voor de kleurintensiteit, vergelijkbaar met deze die we gebruiken voor de NTR - reactie.

Teneinde de ouderdom van de mosselen te bepalen werd een eerste test gedaan om de "acetate peel" methode toe te passen. Bij deze methode wordt de schelp doorgezaagd door de umbo en langs de lijn van maximale schelpgroei. Een van de schelphelften wordt op de zaagsnede gepolierd. Deze zaagsnede wordt ingeetst met HCl gedurende 10-20 sec. Het inetsen gebeurt sneller op de plaatsen waar de schelp sneller gegroeid is en de kristallen groter zijn. Nadien wordt een afdruk gemaakt van de ingeetste zaagsnede op een

acetaatfolie. Als resultaat vertoont de folie de dagelijkse groeiringen. Op deze acetaatafdrukken kunnen de verschillende groeiringen (winterringen, verstoringringsrings, reproductieringen) onderscheiden worden. De ouderdom van de mossel kan daardoor nauwkeurig geschat worden.

De praktische uitwerking van deze methode leverde grote problemen. Alhoewel wij kunnen beschikken over verschillende types van zagen, gebruikt voor het maken van slijppreparaten, zijn we er nog niet in geslaagd om een goede zaagsnede te verkrijgen. De fijne zagen, die in principe het meest geschikt zijn, zijn te zwak om de vrij grote schelpen door te zagen. De trillingen die in de schelp ontstaan hebben een diamantzaagje doen breken, waarna wij onze pogingen moesten staken. De grotere zagen hebben het nadeel dat een grove zaagsnede ontstaat. Bovendien is het niet mogelijk de mosselen voldoende vast te klemmen om een rechte zaagsnede te verkrijgen.

Op dit ogenblik zijn we bezig verschillende inbeddingsmiddelen uit te proberen. De mosselen zullen ingebed worden in blokjes EPON of methylacrylaat, en dan gezaagd worden. Dit vrij arbeidsintensief proces heeft nog niet tot bevredigende resultaten geleid, zodat we nog geen ouderdomsbepalingen hebben kunnen verrichten. We hopen nochtans de technische problemen in de komende maanden op te lossen.

De reproductieve toestand van de bestudeerde mosselen werd eveneens gevolgd. Van elke mossel worden enkele coupes gekleurd met een algemene kleuring (Papanicolaou-kleuring, d.i. een haematoxyline - eosine kleuring). Deze coupes worden gebruikt als controle op het proces van preservatie der weefsels en snijden der coupes (bv. ontdooiing van de weefsels, niet snel genoeg invriezen, problemen met het mes van de cryostaat,...). Tegelijk geven deze coupes een beeld van de reproductieve toestand. Voor de monsters die tot nu toe werden genomen, werd de reproductieve toestand beschreven als een van de drie volgende categorieën: geen follikels aanwezig, (gedeeltelijk) lege follikels aanwezig ("post - spawning"), rijpende of rijpe follikels aanwezig. Deze classificatie was voldoende om te zien dat er weinig of geen reproductie plaatsvindt in de herfst. Opvallend was wel dat de reproductieve periode van de mannetjes langer is dan die van de wijfjes.

Tijdens de lente van 1987, wanneer de ontwikkeling van de gameten en de gametenafzet zal plaatsvinden, zullen meer individuen gevolgd worden, om een beter beeld te verkrijgen van de timing van de reproductie. In het kader van een ander project werd een goede en snelle methode ontwikkeld om de reproductie - cyclus van de mossel te volgen. Van een dertigtal mosselen wordt een stuk mantelweefsel gefixeerd. Deze stukken worden met tien tegelijk ingebed in paraffine, gesneden en gekleurd met Papanicolaou. De

reproductieve toestand wordt dan beschreven aan de hand van de relatieve oppervlakte ingenomen door twee types bindweefselcellen (vesicular connective tissue (VCT) en adipogranulaire (AG) cellen), ontwikkelende gameten, rijpe gameten en lege follikels (na afzet der gameten). Een beschrijving van deze techniek wordt gegeven door Wittevrongel (1986).

Monsternamen.

De monsters van een eerste campagne (eind mei 1986) zijn helaas verloren gegaan ten gevolge van het uitvallen van een diepvriezer. (Deze diepvriezer is nu vervangen door een nieuw type, uitgerust met een alarminstallatie). We beschikken daarom nu over volgende monsters:

Datum	Lokaties
07/07/86	Nieuwpoort, Oostende
26/08/86	Nieuwpoort, Oostende
06/10/86	Nieuwpoort, Oostende
20/10/86	Koksijde, Nieuwpoort, Middelkerke, Wenduine, Knokke, Breskens.
03/12/86	Nieuwpoort, Oostende

De monsters van de eerste drie campagnes zijn op dit ogenblik volledig verwerkt. Van de grote campagne op 20/10 moeten nog enkele kleuringen uitgevoerd worden, alsook de controle van de resultaten.

Voorlopige resultaten.

In Tabellen 1 en 2 zijn de voorlopige resultaten van de eerste drie monstercampagnes verwerkt. Zoals hoger vermeld zijn de Timm sulfide en de lipofuscine reacties nog niet gequantificeerd. Zij zijn dan ook nog niet in deze tabellen opgenomen. Voorlopig moeten wij ons ertoe beperken op te merken dat de reacties positief zijn in alle onderzochte mosselen.

Lokatie	Datum	n	Lys. stabiliteit		NTR	
			$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
Oostende	07/07/86	11	12.3	2.6	1.4	0.7
	26/08/86	11	5.4	5.3	1.9	0.9
	06/10/86	10	2.0	0.0	1.9	0.7
Nieuwpoort	07/07/86	10	12.2	5.4	0.7	0.8
	26/08/86	10	19.5	5.5	2.7	0.9
	06/10/86	10	2.3	1.0	1.5	0.5

Tabel 1: Destabiliseringstijd van de lysosomale membranen (min.) en relatieve activiteit van NADPH - neotetrazolium-reductase (NTR). NTR-activiteit wordt beoordeeld in een schaal gaande van 0 (geen reactie) tot 5 (zeer intense reactie). De gegeven waarden zijn het gemiddelde en de standaarddeviatie van n waarnemingen.

		Shikata		Reproductie		
Monster	n	$\bar{x}$	s	deg.	geen	ontw./rijp
Oostende						
07/07/86	11	-1.0	0.0	8	2	1
26/08/86	11	-0.3	0.5	6	5	0
06/10/86	10	0.2	0.3	1	8	1
Nieuwpoort						
07/07/86	10	0.8	0.4	7	2	1
26/08/86	10	-0.2	0.4	6	1	3
06/10/86	10	0.2	0.9	3	7	0

Tabel 2: Relatieve intensiteit van de Shikata - reactie voor metalloproteinen, en overzicht van de reproductieve toestand van de mosselen. Een negatieve Shikata - reactie wordt als -1 gescoord, een zeer zwak positieve reactie (plaatselijk enkele granules) als 0, en een algemeen positieve reactie als +1. De gegeven waarden zijn het gemiddelde en de standaarddeviatie van n waarnemingen. De reproductieve toestand wordt beschreven als het aantal individuen dat degenererende follikels vertoont (deg.), geen follikels vertoont (geen), ontwikkelende en rijpe follikels vertoont (ontw./rijp)

Bijlage 1: principes en methoden van de reeds vorig jaar gebruikte histochemische testen. B

Bayne et al. (1985) thoroughly review the principles, methodology and results of the lysosomal destabilisation and NTR methods. We will only briefly summarize these aspects here. Extensive reference lists may also be found in Bayne et al. (1985).

The lysosomal-phagosomal complex is an intracellular system consisting of membranes to which (in normal conditions) mostly inactive hydrolytic enzymes are bound. Several stress factors may destabilize the lysosomal membranes, thus activating the hydrolytic enzymes which catabolize both cellular components and certain xenobiotics. Destabilization is preceded by sequestration and accumulation of the xenobiotics in the lysosomes. This process has been shown to operate with a large variety of compounds, e.g. viruses, aromatic hydrocarbons, metal ions etc.. Overloading of the storage capacity results in activation of the degradative enzymes.

The test for lysosomal stability is performed by destabilising the lysosomal membranes in an acid buffer solution (pH = 4.5) during successively longer intervals (2, 5, 10, 15, 20, 25 min.). After destabilization a histochemical staining is performed for one of the lysosomal enzymes. Colour intensity is proportional to enzyme activity. As the enzymes themselves are also destabilized by the acid, a peak coloration is found at that time when the membranes have just been stabilized.

A decrease of the lysosomal destabilization time has been observed as a result of a wide variety of stress conditions: hyperthermia, hypoxia, starvation, spawning, injection of aromatic hydrocarbons and water-soluble crude oil fractions. The level of the response correlates well with the level of the stress stimulus. On the other hand, it correlates also with the physiological measurements (e.g. scope for growth).

NADPH-neotetrazolium reductase (NTR) is linked with the microsomal (smooth endoplasmatic reticulum) mixed-function oxidases. These enzyme systems play an important role in oxidizing (and detoxifying) toxic organic compounds in the cytoplasm. NTR represents the NADPH-oxidizing activity of the microsomal respiratory chains terminating in cytochrome P-450. Experiments have shown that its activity is stimulated by aromatic hydrocarbons, phenorbital, and the water-soluble fraction of crude oil. It is believed that a stimulation of its activity results only from this group of stressors.

The Shikata - test for metalloproteins (Shikata et al., 1974) is somewhat less validated than the other two methods. An acid permanganate solution is used (on fixed sections) to oxidise sulphhydryl groups in metal-binding proteins, thereby removing the metal ions. The sulphonic acid residues remaining are stained by orcein, forming blue - purple granules (Jain et al. 1978). Staining is recorded on presence - absence basis of these granules. It should be noted that in contrast to the claims in some papers (e.g. Johnson et al., 1984) this method is not specific for metallothioneins. In principle all metal-binding proteins (and in addition other compounds, such as elastic fibres) are stained. One can only expect a quantitative difference between metallothioneins and other proteins.

Relatively high concentrations of heavy metals, well above the recorded total concentrations in the Belgian coastal zone, are needed to activate the formation of metallothioneins above the background level in *M. edulis*

10 μ m thick transverse (cryostat) sections of the digestive gland were cut with a cryostat American Opticals (hand-operated, cabinet temperature $< -25^{\circ}\text{C}$). The tissues were fixed in aromate-free frozen hexane, cooled in liquid N_2 . Size limitations of the cryostat tissue holders allowed for maximum three mussels to be cut together, and placed on the same object glass.

The mussels from the coastal populations were dissected upon transfer to the laboratory in damp air at ambient temperature (duration: 1-3 h between collection and fixation).

For the histochemical stainings we followed very closely the protocols, established by IMER and WRC. We shall mention here only a few relevant details:

- + Fixation of the sections for the Shikata-test was not done by submersion in Baker's formol. Instead the sections were placed in a closed container at 55°C for 2 h, together with a sufficient amount of formaldehyde in powder form. This method gives better fixation (Moore, pers. comm.) and prevents loosening of the sections from the object glasses.

- + Orcein (of which several forms exist) was purchased from UCB.

- + The destabilisation of the lysosomal membranes can be detected by staining for either of three different lysosomal enzymes: N-acetyl- β -hexosaminidase, β -glucuronidase and arylsulfatase. In principle the three methods should yield the same results, since all three enzymes are activated upon destabilization of the membranes. We have tried the three methods for two series of mussels, and could confirm that the results are identical. The staining of N-acetyl- β -hexosaminidase gives by far the most intense

staining. This enzyme is the most prevalent of the three in *M. edulis* (Moore, pers. comm.). Therefore this method was adopted for the rest of the samples.

Bijlage 2: protocol van de bepalingen van stabiliteit der
lysosomale stabiliteit en NTR-aktiviteit, en van de
Shikata-test.

Determination of lysosomal stability - a general response to stress. Lysosomal activity of the enzymes N-acetyl- β -hexosaminidase, β -glucuronidase and arylsulphatase is demonstrated using naphthol AS-B1 substrates. Post coupling with diazonium salts prevents inhibition by the coupler.

1. Pre-treat sections in labilising solution for five minute steps (ie 25, 20, 15, 10, 5 and 2 minutes).
2. Rinse in distilled water.
3. Incubate in medium for 20 minutes at 37°C in shaking waterbath.
4. Rinse in Saline for 2 minutes at 37°C.
5. Incubate in diazonium coupler for 10 minutes at room temperature.
6. Rinse in running tap water.
7. Fix in calcium formol at 10 minutes at 4°C.
8. Rinse in distilled water.
9. Mount in aqueous medium.

Reagents: 1. Labilizing Solutions

1(a) For N-acetyl- β -hexos^aaminidase
0.1 M Citrate Buffer (pH 4.5) containing
2.5% NaCl (w:v)

1(b) For β -glucuronidase and arylsulphatase
0.1 M Acetate Buffer (pH 4.5) containing
2.5 NaCl (w:v)

2. Incubation media

2(a) For β -Hexosiminidase
20 mg naphthol AS-B1-N-acetyl- β -D glucosaminide
2-methoxyethanol 2 ml
(keep this mixture in the cryostat until
ready for its use)

Make up to 50 ml with
0.1 M citrate buffer (pH 4.5) containing
2.5% NaCl (w:v)
3.5 g low viscosity polypeptide

2(b) For β -glucuronidase
naphthol AS-B1- β -D-glucuronide 14 mg
50 mM NaHCO₃ 0.6 ml

Make up to 50 ml with
0.1 M acetate buffer (pH 4.5) containing
2.5% NaCl (w:v)
3.5 g low viscosity polypeptide

2(c) For arylsulphatase
naphthol AS-B~~1~~-Sulphate 30 mg
2-methoxyethanol 2 ml
Make up to 50 ml with
0.1 M acetate buffer (pH 5.5) containing
2.5% NaCl (w:v)
3.5 g low viscosity polypeptide

3. Saline 3% NaCl

4. Diazonium coupler

0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)
Fast violet B

1 mg ml⁻¹

5. Calcium formol

2.5% NaCl (w:v)

Control: A section pre-treated for 2 minutes.

Results: Examination at c 300 x magnification for Blue/Purple granules in the digestive glands.

Scored on a presence or absence basis.

Determination of Neotetrazolium reductase (NTR) activity.

An assay for enzymes involved in organic xenobiotic detoxication.

1. Surround the sections with a plastic enclosure to maintain a 2-3 mm depth of medium over the sections.
2. Incubation is carried out in the dark, at 37°C for 30 minutes under a nitrogen atmosphere in an enclosed container containing damp tissue to maintain high humidity.

Reagents: 100 mM HEPES Buffer (pH 8.0) containing
20 mM Magnesium chloride
20% w:v polyvinyl alcohol (MW c 12000)
6 mM NADPH
5 mM neotetrozolium chloride

Purge the medium with nitrogen for 5 minutes prior to use.

Control: Omit NADPH from the incubation medium.

Results: Examination at c 300 x magnification for dark red or blue granules and score on a 0-5 scale.

SHIKATA test for the determination of the presence of metalla-proteins in the digestive gland. The technique is that developed and used by IMER Plymouth.

1. Fix the sections in Bakers solution and rinse in tap water.
2. Treat with acid permanganate for 15 minutes.
3. Rinse in distilled water.
4. Decolourise in 1% oxalic acid.
5. Rinse in distilled water.
6. Stain in Orcein 2-4 hours at room temperature.
7. Rinse in tap water.
8. Differentiate in 1% HCl in 70% alcohol.
9. Dehydrate through alcohol, clear in xylene and mount.

Reagents: 1. Bakers solution

2. Acid Permanganate

5% Aq Potassium Permanganate	9.5 ml
3% Sulphuric acid	5.0 ml
Distilled water to	100 ml

3. Orcein stain

Orcein	1 g
70% Alcohol	100 ml
Conc Hydrochloric Acid	2 ml
(pH 1.0 > 2.0)	

Control: Known positive tissue.

Results: Examination at c 300x magnification for Blue/Purple granules in the digestive glands.

Scored on a presence or absence basis.

Bijlage 4: Protocol van de bepaling van
lipofuscine-accumulatie.

Fixeer in Baker's formol	15 min
Ferricyanide oplossing	5 min
Was in kraantjeswater	
Tegenkleuring van de kernen in 1 % neutral red	3 min
Snelle dehydratering, monteren.	

Ferricyanide oplossing:
meng drie delen 1 % FeCl_3 of $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$
een deel vers bereid 1 % kalium ferricyanide
gebruik binnen de 30 min

Bijlage 3: Protocol van de Timm sulfide methode.

0.1% Na ₂ S in fosfaatbuffer pH 7.4 (0.1 M)	10 min
Glutaaraldehyde 1 % in buffer	1 uur
Glutaaraldehyde 1 % in buffer	3 uur
Buffer	2 x 15 min
Aq. dest.	4 x 15 min
Alcohol 70 % enz. naar parafine	

Deparafineren	
Aq. dest.	4 x 2 min
Ontwikkelaar	1 uur
Aq. dest.	4 x 2 min
Alcian blue	5 sec
Spoelen, alcohol 70 %, dehydrateren, monteren.	

Fosfaatbuffer : 0.1 M ph 7.4

A: 28.5 g Na₂HPO₄·2H₂O in 1600 ml Aq. dest.

B: 6.9 g NaH₂PO₄·H₂O in 500 ml Aq. dest.

A/B = 4/1

Ontwikkelaar:

50 ml arabische gom 50 % + thymol

0.7 g hydrochinon (in 10 ml)

0.25 g citroenzuur (in 1 ml A.D.)

voor gebruik toevoegen: 0.1 g AgNO₃ (in 1 ml A.D.)

Referenties.

Bayne, B.L., D.A. Brown, K. Burns, D.R. Dixon, A. Ivanovici, D.R. Livingstone, D.M. Lowe, M.N. Moore, A.R.D. Stebbing, J. Widdows. 1985.

The effects of stress and pollution on marine animals.
Praeger, New York. 384 pp.

Dansch, G. & J. Zimmer. 1978. An improved Timm Sulphide silver method for light and electron microscopic localization of heavy metals in biological tissues.
Histochemistry 55: 27-40.

Herman, P.M.J., M. Habets, C. Heip, J.M. Bouquegneau & C. Dopagne. 1986. Mussel stress experiment - final report.
BMM-UGMM report. 22 pp.

Jain, S., P.J. Scheuer, B. Archer, S.P. Newman and S. Sherlock. 1978. Histological demonstration of copper and copper-associated protein in chronic liver diseases.
J. Clin. Path. 31: 784-790.

Johnson, D., T.J. Lack & R. Davis. 1984. Biological monitoring of the marine environment in relation to the disposal of sewage sludge. Report WRC, 7 pp.

Moore, M.N., J.A. Mayernik & C.S. Giam. 1985. Lysosomal responses to a polynuclear aromatic hydrocarbon in a marine snail: effects of exposure to phenanthrene and recovery. Mar. Envir. Res. 17: 230-233.

Shikata, T. T. Uzawa, N. Yoshiwara, T. Akatsuka and S. Yamazaki. 1974. Staining methods of Australia antigen in paraffin section. Japanese journal of experimental medicine, 44: 25-36.

Widdows, J. 1978. Combined effects of body size, food concentration and season on the physiology of *Mytilus edulis*. J. mar. biol. Ass. U.K., 58: 109-142.

Wittevrongel, K. 1986. Studie van de reproductiecyclus van de mossel *Mytilus edulis* (L.) in de Oosterschelde en de Westerschelde. Licentiaatsverhandeling RUG.